

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 03-277276

(43)Date of publication of application : 09.12.1991

(51)Int.Cl.

C12N 9/10  
A23C 9/152  
C12P 19/18  
// (C12N 9/10  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 02-246792

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 17.09.1990

(72)Inventor : NAKAYAMA TORU  
KODAMA YUKIKO  
AMANO NORIHIDE  
NAKAO MASAHIRO  
SHIBANO YUJI  
AMACHI TERUO

(30)Priority

Priority number : 02 64318 Priority date : 16.03.1990 Priority country : JP

**(54) NOVEL HEAT-RESISTANT BETA-GALACTOSYL GROUP TRANSFERASE, PREPARATION AND USE THEREOF**

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare a  $\beta$ -galactosyl group transferase having high heat stability by culturing a specific microorganism belonging to the genus Actinomyces and subsequently separating the transferase from the cultured product.

CONSTITUTION: A microorganism belonging to the genus Actinomyces and producing a  $\beta$ -galactosyl group transferase having the following physicochemical properties is cultured. The objective novel  $\beta$ -galactosyl group transferase is separated and obtained from the cultured product. The physicochemical properties of the enzyme: (i) the action: [transition reaction]; 1 mole of a novel  $\beta$ -D- galactosylpyranoside Gal-Y and 1 mole of X are produced from 1 mole of  $\beta$ -D- galactosylpyranoside Gal-X and 1 mole of a galactosyl group acceptor Y wherein both X and Y are saccharides or aglycons excluding water, [hydrolysis]; 1 mole of  $\beta$ -D-galactosylpyranoside Gal-X is hydrolyzed to produce 1 mole of X and 1 mole of galactose. (ii) The optimal pH is 5.0-8.0. (iii) The stability of pH is stable at a pH of 5-8 when treated at 55°C for 15 minutes, etc.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-277276

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>C 12 N 9/10  
A 23 C 9/152  
C 12 P 19/18

識別記号

庁内整理番号

7823-4B  
6977-4B  
8214-4B※

⑬ 公開 平成3年(1991)12月9日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全16頁)

⑭ 発明の名称 新規耐熱性β-ガラクトシル基転移酵素、その製造法及びその用途

⑯ 特 願 平2-246792

⑰ 出 願 平2(1990)9月17日

優先権主張 ⑱ 平2(1990)3月16日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平2-64318

㉑ 発 明 者 中 山 亨 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

㉒ 発 明 者 児 玉 由 紀 子 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

㉓ 発 明 者 天 野 典 英 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社基礎研究所内

㉔ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

㉕ 代 理 人 弁理士 小野 信夫

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発 明 の 名 称

新規耐熱性β-ガラクトシル基転移酵素、  
その製造法及びその用途

## 2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 下記の理化学的性質をもつ新規β-ガラクトシル基転移酵素。

## ① 作 用

転移反応:

β-D-ガラクトピラノシド

Gal-X 1モルと、ガラクトシル基  
受容体Y 1モルとから、あらたなβ  
-D-ガラクトピラノシド Gal-Y  
1モルと、X 1モルを生成する。ここで、X、Yはいずれも水以外の  
化合物で、糖あるいはアグリコンで  
ある。

加水分解:

1モルのβ-D-ガラクトピラノシ

ド Gal-Xを加水分解し、1モルの  
Xと1モルのガラクトースを生成す  
る。

## ② 基質特異性

ラクトースおよびp-ニトロフェニル  
-β-D-ガラクトピラノシドを加水  
分解するが、p-ニトロフェニル-α  
-D-ガラクトピラノシドは加水分解  
しない。

## ③ 至適 pH

5.0~8.0

## ④ pH安定性

55℃、15分間の処理の場合、pH  
5以上8以下で安定。

## ⑤ 熱安定性

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)  
中、60℃、1時間のインキュベート  
後でも80%以上の活性を有する。  
あるいは、少なくとも1Mラクトース  
を含有する同上緩衝液中、65℃で少

なくとも24時間インキュベートした後も、80%以上の活性を有する。

(2) 放線菌に属する微生物により産生される請求項第1項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素。

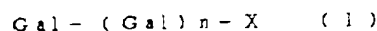
(3) 放線菌に属する微生物がサッカロポリスボラ(*Saccharopolyspora*)属、サーモモノスボラ(*Thermomonospora*)属またはサーモアクチノマイセス(*Thermoactinomyces*)属に属する微生物から選ばれたものである請求項第2項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素。

(4) 放線菌に属し、請求項第1項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を産生する微生物を培養し、該培養物より $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を分離、取得することを特徴とする新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素の製造法。

(5) 放線菌に属し、請求項第1項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を産生す

る微生物がサッカロポリスボラ(*Saccharopolyspora*)属、サーモモノスボラ(*Thermomonospora*)属またはサーモアクチノマイセス(*Thermoactinomyces*)属に属する微生物である請求項第5項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素の製造法。

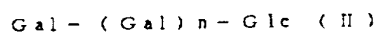
(6) 請求項第1項記載の新規 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を用いることを特徴とする、次の一般式(Ⅰ)



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、nは0-4の整数である)

で表されるオリゴ糖または糖修飾配糖体の製造法。

(7) 請求項第1項記載の $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を乳に作用させ、原料乳中の乳糖の一部または全部を一般式(Ⅱ)



(式中、Galはガラクトース残基を、Glcはグルコース残基を示し、nは1-4の整数である)

で表されるガラクトオリゴ糖に変換することを特徴とするガラクトオリゴ糖含有加工乳の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [産業上の利用分野]

本発明は、新規な $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素、その製造法及びその用途に関するものであり、さらに詳しくは、サッカロポリスボラ属等の放線菌に属する微生物が生産し、高い熱安定性を有する新規な $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素およびその製造法並びにその利用法に関する。

#### [従来の技術]

糖や配糖体を更に糖で修飾することにより、それらの糖や配糖体(以下、「糖類」と略称する)に新たな生理活性や物性を付与できることが知られている。例えば、甘味度を増

加させたり、苦味を緩和あるいは消去したり、水に対する溶解度の低い配糖体(漢方薬の有効成分等にその例が見られる)の水溶性を高めたり、生体内安定性や腸管吸収性を増加させたりする作用が知られている。

糖の修飾により付与される機能やその程度は、用いられる糖および修飾される糖類の種類によって異なるが、糖類をガラクトシル基で修飾することによって、上述の目的に対して好ましい効果を得られる例が多く報告されており、これに基づき様々な機能性オリゴ糖や機能性配糖体が開発されてきた。

例えば次の式



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、mは整数である)で表されるオリゴ糖または糖修飾配糖体において、Xがグルコース残基(Glc)、mが0-4の整数であるオリゴ糖(ガラクトオリゴ糖)は善玉腸内細菌であるビフィズス菌の増

種促進性物質として知られ(特開昭55-104885号)、またその優れた甘味度、甘味質、難う溶性、低カロリー性、加工安定性、保湿度、水分活性低下能、着色性などにより、食品素材として幅広く利用されつつある。

また、蔗糖のガラクトシル化により、前記式においてXがシュークロース、mが0であるガラクトシルシュークロース(特開昭64-85090号)が、また、ラクチュロースのガラクトシル化により、前記式中、Xがラクチュロース、mが0であるガラクトシルラクチュロース(特開昭63-94987号)がそれぞれ得られ、これらもガラクトオリゴ等と同様、新しい機能性食品素材として利用されつつある。更に、甘味配糖体ルブソシドについては、そのガラクトシル化により甘味度、甘味質の改善が達成されている(Argic, Biol. Chem. 53, 2923-2928, 1989)。

以上のように、糖類にガラクトシル基ある

いはオリゴガラクトシル基を付加させ、ガラクトシル基付加物を製造するには、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのガラクトシル基転移反応が利用されている。

この反応は、高温度の $\beta$ -ガラクトピラノシド(例えばラクトース)の存在下、いくつかの $\beta$ -ガラクトシダーゼが、糖(あるいは配糖体の糖部分)への $\beta$ -D-ガラクトシル基転移反応を触媒するという事実に基づいている。

酵素の $\beta$ -D-ガラクトシル基転移能の高さは、その起源によって様々であり、効率良く反応を進めるためには、高い転移能を持つ $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いる必要があった。

従来用いられている $\beta$ -ガラクトシダーゼの例としては、糸状菌アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*, 特公昭55-104885号)、細菌バチルス・サーキュランス(*Bacillus circulans*, 特公昭62-209780号)、ストレプトコッカス・サ

ーモフィラス(*Streptococcus thermophilus*, Food Chem. 10, 195-204, (1983))起源の酵素があり、これらの酵素をラクトースに作用させることにより、実際にガラクトオリゴ糖が製造されている。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をもつ酵母菌体の例としては、リボマイセス(*Lipomyces*)、ロドトルラ(*Rhodotulula*)、シロバシディウム(*Sirobasidium*)、ステリグマトマイセス(*Sterigmatomyces*, 日本農芸化学会誌, 63巻, 3号, 629ページ, 1989年)、スロボロマイセス(*Sporobolomyces*, 特公昭62-208293号)、クリプトコッカス(*Cryptococcus*, 特公昭60-251896号、特公昭62-130695号、特公昭61-236790号)、クリベロマイセス(*Kluyveromyces*, 特公昭61-271999号)などが知られており、これらを利用するガラクトオリゴ糖の製造も試みられている。

通常、 $\beta$ -D-ガラクトシル基の供与体としては、ラクトースを用いるのが産業上もっとも有利である。ラクトースは牛乳中に多量に含まれ、また、海外において酪農廃棄物として多量に産出され、原料としてはもっとも安価であるからである。ちなみに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた乳糖分解乳の製造が既に実用化されていること(フードケミカル, 第7巻, 38-44, (1986))を背景として、転移活性の高い $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いたガラクトオリゴ糖含有加工乳の製造法が近年報告された(特開平1-165234号)。

#### [ 発明が解決しようとする課題 ]

ところで、一般に糖転移反応は、糖供与体(ここではラクトース)の温度が高いほど速やかにかつ収率良く進行する。そして、このためには反応溶液中のラクトースの濃度を上げれば良いのであるが、高温度のラクトース溶液は、常温では粘度が高いうえに結晶が析出しやすく、製造工程上での取り扱いが困

難であるという問題があった。

そこで、反応系の温度を上げて（例えば、60℃以上）、ラクトースの析出を抑え、粘度を低下させることが求められていた。また、溶解度を上げることにより単位体積当たりの反応物（ラクトース等）の仕込み量を多くすればコスト的にも有利であり、しかも化学反応は温度が高いほど早く進行するので、反応系の温度を上げることによって、酵素反応速度を大きくし反応時間を短縮化することも可能となる。更に、反応温度の高温化によって雑菌が生育しにくくなり、また、高温によって達成される高温高圧の高い浸透圧による酵母作用が働き、製造工程の雑菌汚染防止にも役立つことが予想される。

このように、高温によるガラクトシル基転移反応は利点が多いのであるが、このように高温で反応を行なうためには、酵素に高い熱安定性が要求される。更に、上記反応を工業的に有利に利用するためには、付加物の量

産化と製造コストの低減化のために、酵素を固定化し、反応工程を自動化、連続化することが求められている。

一般に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは高濃度のラクトースにより安定化されるが、これを固定化して、高温で長期間にわたり繰り返し使用するためには、さらに高度な耐熱性が要求される。しかし、前述の糸状菌アスペルギルス・オリゼー、細菌バチルス・サーキュランス、ストレプトコッカス・サーモフィラス起源の酵素、あるいはリボマイセス、ロドリラ、シロバシディウム、スポロボロマイセス、クリプトコッカス、クリペロマイセスなどの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をもつ酵母菌体は、熱安定性が必ずしも高くなく、高温での繰り返し使用には適切ではない。

一方、熱安定性を有し、しかも高温繰り返し使用に耐えうる $\beta$ -ガラクトシダーゼとしては、ペシロマイセス (*Pseudomonas varioli*) の酵素 (Appl. Microbiol.

Biotechnol. 27, 383-388, 1988) が知られているが、この酵素の反応最適pHは3.5であって、例えば牛乳 (pH 7付近) 中のラクトースを利用する製造工程には不適当であった。

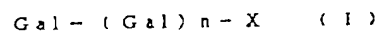
したがって、実際の高温酵素反応に適する酵素の提供が求められていた。

#### [課題を解決するための手段]

本発明者らは、高い $\beta$ -D-ガラクトシル基転移能ならびに高い熱安定性をもち、中性域で作用しうる酵素を自然界より探索した結果、放線菌に属する微生物、特にサッカロポリスボラ (*Saccharopolyspora*)、サーモモノスボラ (*Thermomonospora*) またはサーモアクチノマイセス (*Thermoactinomyces*) に属する菌株中に上記の目的にかなう $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を生産するものがあることを見いだした。

そして、これらの菌株を液体培養または固体培養することにより $\beta$ -ガラクトシル基転

移酵素を生産させ、これを必要に即して精製純化あるいは固定化することにより、一般式 (I)



(式中、Galはガラクトース残基を、Xは糖類若しくは配糖体を示し、nは0-4の整数である)

で示されるオリゴ糖あるいは糖修飾配糖体の製造に利用することができることを見出した。

即ち、本発明は、新規な $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素、該酵素の製造法、および該酵素の利用法を提供するものである。

本発明の $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素は、放線菌に属する微生物、特にサッカロポリスボラ、サーモモノスボラ、サーモアクチノマイセス等に属する菌株の培養物から得ることができる。

本発明者らは、前記したように、高い熱安定性を有し、中性域で作用しうる $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素生産菌を自然界より探索し

た結果、上記に属する菌株中に目的とする $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を生産するものが存在することを見いだしており、その中でも特に石川県の牧草地土壌から分離したサッカロポリスボラに属する菌株、SAM 1400株が、目的とする $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素をとりわけ多量に生産している。

そこで、本発明において用いることができる $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素産生菌の代表例として、微生物 SAM 1400株をあげ、その菌学的特徴を以下に述べる。

#### 菌 学 的 特 徴 :

##### (1) 形態学的所見

SAM 1400株は、直径 0.4~0.8  $\mu$ m の基底菌糸および気中菌糸を形成する。基底菌糸は分岐し、まれに分断が認められる。気中菌糸は分岐し、その先端に3ないし7個、まれに10個以上の直鎖状の孢子連鎖を形成する。一方、気中菌糸を形成していない場合でも、基底菌糸において2ないし6個の孢

子鎖を、寒天培地内部、寒天培地表面、および表面より気中に向かって形成する。孢子は球状であり、その大きさは直径 0.8~1.0  $\mu$ m で、その表面は平滑である。孢子囊、菌糸束、菌核などの構造体は、14日培養後も認められなかった。

##### (2) 培養所見 (55℃、14日間培養)

###### ショ糖・硝酸塩寒天培地:

生 育 : 貧 弱  
気中菌糸 : 形成せず  
裏面の色調 : 灰黄色  
可溶性色素 : な し

###### グルコース・アスパラギン寒天培地:

生 育 : 貧 弱  
気中菌糸 : 形成せず  
裏面の色調 : 灰黄色  
可溶性色素 : な し

###### グリセリン・アスパラギン寒天培地:

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : 形成せず

裏面の色調 : 薄黄色  
可溶性色素 : な し

###### スターチ・無機塩培地:

生 育 : 貧 弱  
気中菌糸 : 形成せず  
裏面の色調 : 黄 色  
可溶性色素 : な し

###### チロシン・寒天培地:

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : 形成せず  
裏面の色調 : 灰黄色  
可溶性色素 : な し

###### 栄養寒天培地:

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : かすか  
裏面の色調 : 黄 色  
可溶性色素 : な し

###### 酵母エキス・麦芽エキス寒天培地:

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : 貧弱、白色

裏面の色調 : 黄褐色  
可溶性色素 : な し

###### オートミール寒天培地:

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : 形成せず  
裏面の色調 : 黄 色  
可溶性色素 : な し

###### NaCl寒天培地\*

生 育 : 良 好  
気中菌糸 : 豊富、白色  
裏面の色調 : 黄 色  
可溶性色素 : な し

\*10% NaClを含むトリブチケースソイブロス(BBL)+2%寒天培地

##### (3) 生理学的所見

###### ① 生育温度範囲

1%グルコースを含む栄養寒天培地で、50℃、55℃、65℃での生育が認められ、トリブチケースソイブロス(BBL)+2%寒天培地で、30℃、37℃での生

育が認められた。最適生育温度は50～55℃と思われた。

② ゼラチンの液化(55℃)

ゼラチン液化試験用培地のいずれにおいても、生育が認められなかった。

③ スターチの加水分解： 陰 性

④ 脱脂乳の凝固： 陰 性

⑤ 脱脂乳のペプトン化： 陰 性

⑥ メラニン様色素の生成

ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地：

陰 性\*

チロシン寒天培地： 陰 性

トリプトン・酵母エキス寒天培地：

陰 性

\*：培地の底に、薄褐色の色素の沈降が見られる。

⑦ 硝酸塩の還元： 陽 性

⑧ 10% NaCl耐性： 陽 性

⑨ グアニンの分解： 陽 性

⑩ エラスチンの分解： 陰 性

(アブライド マイクロバイオロジー (Applied Microbiology), 28巻, 226ページ, 1974年)に準拠して調べた結果、メソ-2,6-ジアミノピメリン酸の存在が認められた。

(b) 糖

全菌体の加水分解物中に、アラビノースとガラクトースの存在が認められた。

(c) キノン系

MK-9(H4)を主成分として有し、そのほかにMK-9(H6)、MK-9(H8)、MK-10(H4)、MK-10(H6)、MK-10(H8)、MK-10(H10)を有していた。

(d) リン脂質タイプ

フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロールを含む。これは、ルシェバリエ M. P. (Lechevalier, M. P.) および H. A. ルシェバリエ (H. A. Lechevalier) (A. Dietz and D. W.

⑪ キサンチンの分解： 陽 性

⑫ ヒポキサンチンの分解： 陽 性

⑬ 炭素源の利用性(ブリードハム・ゴトリブ寒天培地、55℃、17日間培養)：

D-グルコース +

D-キシロース +

ラクトース +

L-ラムノース ±

L-アラビノース ±

D-フルクトース +

ラフィノース -

D-マンニトール +

イノシトール +

シュクロース -

ただし、+；利用する、±；利用するかどうか疑わしい、-；利用しない。

(4) 化学分類学的性質

(a) 2,6-ジアミノピメリン酸

全菌体を、スタネック (Staneck, J. L.)

およびロバーツ (Roberts, G. D.) の方法

Thayer (編)、アクチノマイセート タクソノミー (Actinomycete Taxonomy)、227-291頁、1980年)によるP-IIIタイプに属する。

(e) ミコール酸

菌体内にミコール酸を含まない。

これらの結果から、SAM 1400株の細胞壁は、メソ-2,6-ジアミノピメリン酸とガラクトース、アラビノースを含む、IV-Aタイプと判断される。

形態的特徴としては、SAM 1400株は気中菌糸を形成し、分岐して平滑な球状の胞子を連鎖上に着生する。胞子の連鎖は短く、その数は3～7個が普通で、まれに10個以上の胞子連鎖も認められる。その一方で、気中菌糸の形成が認められないときには、基底菌糸において、胞子連鎖の形成が認められた。これは、基底菌糸から短い胞子柄(認められない場合もある)の先に2～6個の平滑な球状の胞子が寒天培地表面より上に向か



って連鎖するものである。キノン系はMK-9 (H4) を主成分として有し、リン脂質タイプはP-I I Iで、ミコール酸を含まない。グアニン、ヒポキサンチン、キサンチンを分解し、エラスチンを分解せず、30～65℃で生育し、10% NaClに耐性を示す。

以上の菌学的性質より、S.T.ウィリアムス(S.T. Williams) 編の、バージェイズ マニュアル オブ システマティック バクテリアロジー、第4巻、1989年(Williams, S.T. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol4, 1989)に従って、本菌株の分類学的位置を求めたところ、SAM 1400株はファエニア・レクチヴィルグラ(*Faenia rectivirgula*)に属する放線菌であることが判明した。

そこで、F.レクチヴィルグラ(*F. rectivirgula*)の基準菌株と同種と同定された菌株2株を入手し、SAM 1400株と

培養性状、生理的性状及びキノン系の比較試験を行った。その結果を第1表に示す。

(以下余白)

第 1 表

特 性	SAM 1400	F. レクチヴィルグラ JCM-3057	F. レクチヴィルグラ JCM-3089	F. レクチヴィルグラ JCM-3034
気中菌糸形成能	菌糸であるが、10% NaCl添加で促進される。	菌糸であるが、10% NaCl添加で促進される。	菌糸であるが、10% NaCl添加で促進される。	菌糸であるが、10% NaCl添加で促進される。
気中菌糸の色調	白	白	白	白
可溶性色素の生成	—	—	—	—
10% NaCl存在下での生育	+	+	+	+
30℃での生育	+	+	+	+
65℃での生育	+	+	+	—
グアニンの分解	+	+	+	—
エラスチンの分解	—	—	—	—
キサンチンの分解	+	+	+	—
ヒポキサンチンの分解	+	+	+	—
固態媒の還元	+	+	+	—
ミルクの凝固、ペプトン化	—	—	—	—
スターチの分解	—	—	—	—
ゼラチンの液化	生育せず	生育せず	生育せず	—
(炭素源の利用性)				
D-グルコース	+	+	+	+
D-キシロース	+	+	+	±
ラクトース	+	+	+	—
L-ラムノース	±	—	±	—
L-アラビノース	±	—	±	—
D-フルクトース	+	+	+	+
ラフィノース	—	—	—	—
D-マンニトール	+	+	+	+
イノシトール	+	+	+	+
シュクロース	—	—	—	—
(メナキノンの組成 <sup>*)</sup> )				
MK-9 (H4)	++	+++	++	+++
MK-9 (H6)	+	+	+	+
MK-9 (H8)	+	—	+	痕跡
MK-10 (H4)	+	+	+	—
MK-10 (H6)	+	+	+	—
MK-10 (H8)	+	—	+	—
MK-10 (H10)	痕跡	—	+	—

\* 含有するメナキノンの組成比(%)を、以下のように4段階に分けて表示した。  
痕跡: <3%, +: 3~14%, ++: 15~49%, +++: >50%

第1表に示すようにSAM 1400株とF.レクチヴィルグラの基準株を含む3株は、非常に良く一致する菌学的性質を示した。

以上のことから、本発明者らはSAM 1400株をF.レクチヴィルグラであると同定した。しかしながら、コーン-ウエンデッシュ(Korn-Wendisch)ら(インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology) 39巻、430-441頁、1989年)は、菌体脂肪酸組成、キノン系、リン脂質タイプ等の化学分類学的性質によって、ファエニア属はサッカロポリスボラ属と同一であるとし、F.レクチヴィルグラをサッカロポリスボラ属に移し、新組合せ、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラ(*Saccharopolyspora rectivirgula*)を提唱している。

そこで、本発明者らは、コーン-ウエンデッシュら(インターナショナル ジャーナル オブ システマティック バクテリオロジー

(International Journal of Systematic Bacteriology) 39巻、430-441頁、1989年)に従い、本菌株をサッカロポリスボラ・レクチヴィルグラと同定した。

なお、SAM 1400株は、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラ SAM 1400 (*Saccharopolyspora rectivirgula* SAM 1400)と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に、受託番号微工研発第 2768号 (FERM BP-2768)として寄託されている。

また、他の属に属する本発明の新規β-ガラクトシル基転移酵素産生微生物の例としては、サーモアクチノマイセス S P. SAM 1544 (*Thermoactinomyces* sp. SAM 1544)、サーモアクチノマイセス S P. SAM 1545 (*Thermoactinomyces* sp. SAM 1545)、サーモモノスボラ S P. SAM 1546 (*Thermomonospora* sp. SAM 1546)、サーモモノスボラ S P. SAM 1547

(*Thermomonospora* sp. SAM 1547)等が挙げられる。

これらの微生物も、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に、受託番号微工研発第 2769号 (FERM BP-2769)、同 2770号 (FERM BP-2770)、同 2771号 (FERM BP-2771)、同 2772号 (FERM BP-2772)として寄託されている。

上記各微生物を利用する新規β-ガラクトシル基転移酵素の製造は、常法にしたがって当該微生物を培地に接種し、これを培養することにより行なわれる。

各菌株の培養は、通常行なわれている通気攪拌培養、振盪培養、静置培養等の液体培養法もしくは固体培養法により行なうことができる。

培地は、炭素源として、ラクトース、グルコース、シュクロース、デンプンなど、窒素源としてペプトン、酵母エキス、尿素、硫酸アンモニウム、アミノ酸などを、無機塩とし

ては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウムなどや、また必要に応じてMn<sup>++</sup>、Zn<sup>++</sup>、Ni<sup>++</sup>等の微量元素、ビオチン、チアミンなどのビタミン類等を適宜加えたものを用いる。

培養温度は生育できる温度範囲ならとくに限定されないが、50℃付近が望ましい。また、培養は、24～192時間程度行なわれる。

かくして得られた培養物から本発明のβ-ガラクトシル基転移酵素を採取するには、まず遠心分離法や濾過法などにより培養物をブ罗斯画分と菌体画分に分離する。β-ガラクトシル基転移酵素活性画分につき、さらに限外濾過、透析、塩析、溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、等電点沈殿など周知の方法を、単独あるいは組み合わせて行なうことにより、β-ガラクトシル基転移酵素の濃縮あ

るいは精製標品を得ることができる。

以上のようにして分離、精製された、本発明の $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素のうち、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラSAM 1400の産生する酵素の酵素化学的性質はつぎのとおりである。

#### 酵 素 化 学 的 性 質 :

##### (1) 作 用

##### 転移反応:

$\beta$ -D-ガラクトピラノシド

Gal-X 1モルと、ガラクトシル基受容体Y 1モルとから、あらたな $\beta$ -D-ガラクトピラノシド Gal-Y 1モルと、X 1モルを生成する。

ここで、X、Yはいずれも水以外の化合物で、糖あるいはアグリコンである。

##### 加水分解:

1モルの $\beta$ -D-ガラクトピラノシ

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.0-8.0) における最適 pH は 7.2 であった。

##### (5) 基質特異性ならびにミカエリス定数

各種の $\beta$ -ガラクトピラノシドおよびその類縁体について、基質濃度 10 mM における加水分解反応を行なった結果を第2表に示す。

(以下余白)

D Gal-X を加水分解し、1モルの X と 1モルのガラクトースを生成する。

##### (2) pH 安定性

0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5-6.5)、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.0-8.0)、あるいは 0.01 M ピロリン酸緩衝液 (pH 8.0-9.5) 中で 55℃、15 分間インキュベートし、各 pH での残存活性を測定した結果、pH 5.0 以上で安定であった。

##### (3) 熱安定性

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中にて、30~80℃で1時間インキュベートし、各温度における残存活性を測定した結果、60℃まではほぼ安定であった。また 1 M ラクトースを含有する 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で、65℃、24 時間処理し、残存活性を測定した結果、失活は認められなかった。

##### (4) 最適 pH

第 2 表

基 質 (10 mM)	相対活性
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド	100%
p-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシド	0%
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-キシロピラノシド	> 1%
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノシド	> 1%
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-フルコシド	0%
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-マンノシド	0%
ラクトース	161%

## (6) 分子量

TSK-G3000 SW-XLカラムを用いた高速液体ゲルクロマトグラフィー（移動相：0.15M KClを含む0.01Mリン酸緩衝液 pH 7.2、流速：1.0 ml/min）により、オリエンタル酵母社製の各種標準タンパク質との相対溶出保持時間から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は $140,000 \pm 20,000$ であった。

## (7) サブユニット分子量およびサブユニット構造

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法により本酵素のサブユニットの分子量を求めたところ、 $140,000 \pm 20,000$ であった。ファストゲル（Phast-Gel）電気泳動装置を用い、各種標準蛋白質との相対移動度から求めた。本酵素は単量体と思われる。

## (8) 阻害剤

本酵素は $Hg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ などの金属イオンおよびエチレンジアミン四酢酸により阻害

された（第3表）。

第 3 表

化 合 物	残存活性
$CdCl_2$	96%
$ZnCl_2$	122%
$CaCl_2$	87%
$BaCl_2$	96%
$NiCl_2$	59%
$MnCl_2$	103%
$CoCl_2$	97%
$FeCl_2$	87%
$CuCl_2$	28%
EDTA	5%
2-メルカプトエタノール	96%
DTNB	107%
モノヨード酢酸	69%

## (9) 活性測定

p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドの加水分解の活性測定は、基質の加水分解により生成するp-ニトロフェノールを分光学的に追跡することにより行なった。

すなわち、0.01Mのp-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを含有する0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）0.60mlに、0.10 mlの酵素液を加え、405nmにおける吸光度の増加を55℃において追跡した。p-ニトロフェノールの生成量（ $\mu$ mol）を、pH 7.2におけるp-ニトロフェノールの分子吸光係数（ $\epsilon_{405} = 1.34 \times 10^4$ ）を用いて計算により求めた。p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドの加水分解により定義した酵素1単位（pNPGU）は、1分間に1  $\mu$ molのp-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを加水分解する酵素量である。ラクトースの加水分解の活性測定は、基質の分解により生成するグルコースを分光

学的に定量することにより行なった。すなわち、0.1Mのラクトースを含有する0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2）0.90mlに、0.10mlの酵素液を加え、55℃で10分間反応させ、33%トリクロロ酢酸0.05mlを加えて反応を停止させた。反応停止させた上記反応液0.1mlに、ペーリンガーマンハイム社製グルコース定量キット1.0mlを加え、室温で45分間放置したのち、660nmにおける吸光度を測定した。ラクトースの加水分解により定義した酵素1単位（LU）は、1分間に1  $\mu$ molのラクトースを加水分解する酵素量である。

本発明の $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素は、上記の酵素化学的諸性質から新規であると判断された。

## [ 実施例 ]

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

## 実施例 1

ラクトース 3.0%、アミノサンV3（甜菜抽出物）1.4%、グルタミン酸1ナトリウム塩 0.2%、酵母エキス 0.1%、リン酸1カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%を含有する培地(pH7.2) 100mlずつを500mlマイヤーフラスコにいれ、120℃ 1気圧にて15分間オートクレーブ殺菌したものに、SAM 1400株を1白金耳ずつ接種し、55℃にて120時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養物を遠心処理して得た上清2.2mlを、10mMリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したイオン交換樹脂セパビーズ(SEPABEADS) EP-DA13カラム（三菱化成製、5cm X 20cm）に負荷し、上記緩衝液、次いで0.3M塩化カリウムを含有する上記緩衝液でカラムを洗浄後、0.5M塩化カリウムを含有する上記緩衝液にてβ-ガラクトシル基転移酵素を溶出した。活性成分を限外濾過法にて濃縮し、10mMリ

(pH7.2)に対して透析した。

以上の操作によりえられた精製β-ガラクトシル基転移酵素の総活性は240pNPGU、比活性は10pNPGU/mgであった。

## 実施例 3

ラクトース5gを0.05M酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解して10mlとし、これに実施例1で得られたβ-ガラクトシル基転移酵素標品10pNPGUを加え、65℃で4時間反応させた。反応液を95℃で5分間処理して反応を停止させ、1部分を10倍に希釈してこれをショーデックス・イオンパックKS801カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（移動相、水；カラム温度、70℃；流速、1ml/min；検出、示差屈折計）で分析することにより、反応液の糖組成を決定した。反応液には、7%の四糖以上のオリゴ糖、21%の三糖類、48%の二糖類、及び24%の単糖類（いずれも全糖に対する重

ン酸緩衝液(pH7.2)に対して透析した。

## 実施例 2

上記透析内液を、10mMリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したイオン交換樹脂DEAE-セファロース(DEAE-Sepharose) CL-6B（ファルマシア製、2.8cm X 20cm）に負荷し、上記緩衝液、次いで、0.2M塩化カリウムを含有する上記緩衝液にてカラムを洗浄後、0.2Mから0.6Mの塩化カリウムの直線濃度勾配（総量400ml）をかけることによりβ-ガラクトシル基転移酵素を溶出した。活性成分を限外濾過法にて濃縮した後、0.15M塩化カリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したTSKゲルG3000SW-XL（東ソー製）に、濃縮液を数回に分けて負荷し、クロマトグラフィーを行なった（流速、1.0ml/min；検出、280nmにおける吸光度）。活性成分を限外濾過法にて濃縮し、10mMリン酸緩衝液

（pH7.2）が含まれていた。

## 実施例 4

5gの酵素固定化用担体FE4612（オルガノ製）を4%NaOH中 50℃で2時間攪拌し、純水にて洗浄後、5%グルタルアルデヒド15mlに懸濁し1時間攪拌する。その後、担体を10mMリン酸緩衝液にて洗浄し、1000Uの酵素を含む10mMリン酸緩衝液中に懸濁し、2時間攪拌して固定化する。担体を10mMリン酸緩衝液にて洗浄し、これを固定化β-ガラクトシル基転移酵素とした。固定化における活性収率は87%であった。固定化β-ガラクトシル基転移酵素1gを、60%（w/v）ラクトースを含有する0.05M酢酸緩衝液(pH6.0) 100mlに懸濁し、65℃で24時間攪拌し反応を行なった。反応液の1部分を10倍に希釈してこれをショーデックス・イオンパックKS801カラムを用いた高速

液体クロマトグラフィー（移動相、水；カラム温度、70℃；流速、1 ml/min；検出、示差屈折計）で分析することにより、反応液の糖組成を決定した。反応液には、3%の四糖以上のオリゴ糖、25%の三糖類、58%の二糖類、及び14%の単糖類（いずれも全糖に対する重量%）が含まれていた。また、以上の反応を1サイクルとしてこれを繰り返し、固定化β-ガラクトシル基転移酵素の活性半減期を1次反応に従うものとして計算により求めたところ、固定化β-ガラクトシル基転移酵素の活性半減期は少なくとも300サイクル以上と求められた。

3%、ペプトン0.2%、酵母エキス0.02%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%、 $\text{NaCl}$  0.3% および $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01%を含む培地（pH 7.2）を用い、55℃で4日間振盪培養してβ-ガラクトシル基転移酵素を得た。

得られたβ-ガラクトシル基転移酵素は、それぞれ第4表に示すような性質を有するものであった。

（以下余白）

#### 実施例 5

サーモモノスポラ sp. SAM 1546、同 sp. SAM 1547、サーモアクチノマイセス sp. SAM 1544 および同 sp. SAM 1545 の4菌株を、500 ml のフラスコ中、100 ml のラクトース

第 4 表

特 性	サーモモノスポラ sp. SAM 1546	サーモモノスポラ sp. SAM 1547	サーモアクチノマイセス sp. SAM 1544	サーモアクチノマイセス sp. SAM 1545
（作用）				
転 移 反 応 <sup>*)</sup>	+	+	+	+
加水分解 <sup>**)</sup>	+	+	+	+
（加水分解の基質特異性）				
ラクトース <sup>*)</sup>	+	+	+	+
p-ニトロフェニル-β-ガラクトシド <sup>*)</sup>	+	+	+	+
p-ニトロフェニル-α-ガラクトシド <sup>*)</sup>	-	-	-	-
最適 pH <sup>*)</sup>	6.0~7.5	6.0~7.5	6.0~7.5	6.0~7.5
pH 安定性 <sup>*)</sup>	5~8	5~8	5~8	5~8
熱安定性 <sup>*)</sup>	約82%	約82%	約88%	約88%

（注）+：触媒する。-：触媒しない。

- \*) 1 M ラクトースを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）中、55℃で240分反応させた。  
 \*\*) 10 mM ラクトースを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）中、55℃で10分反応させた。  
 \*) 10 mM p-ニトロフェニル-β-ガラクトシドを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）中、55℃で5分反応させた。  
 \*) 10 mM p-ニトロフェニル-α-ガラクトシドを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）中、55℃で5分反応させた。  
 \*) 10 mM p-ニトロフェニル-β-ガラクトシドを含む 10 mM の酢酸緩衝液（pH 4.0~8.5）あるいはリン酸緩衝液（pH 6.0~8.5）中、55℃で5分反応させた。  
 \*) 10 mM の酢酸緩衝液（pH 4.0~8.5）あるいはリン酸緩衝液（pH 6.0~8.5）中、55℃で15分間インキュベートした後、直ちに氷冷し、残存活性を\*)の条件下で測定して求めた。  
 \*) 10 mM のリン酸緩衝液（pH 7.2）中、80℃で1時間インキュベートした後、直ちに氷冷し、残存活性を\*)の条件下で測定して求めた。

## 実施例 6

アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 起源のラクターゼ (ヤクルト本社製、ラクターゼ Y-AO)、バシルス・サーキュランス (*Bacillus circulans*) 起源のラクターゼ (大和化成製、ピオラクタ)、および本発明の  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を、それぞれ 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、0.1 mg/ml の溶液を調製した。各酵素溶液を 60℃ で 1 時間インキュベートした後、ただちに氷冷した。次いで、各酵素の残存活性をそれぞれの説明書に記載してある最適条件に従い測定した結果、アスペルギルス・オリゼー起源のラクターゼ、バシルス・サーキュランス起源のラクターゼ、および本発明の  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素の残存活性は、それぞれ 1%、1% および 96% であった。

## 実施例 7

ラクトース 0.5 g を 0.05 M 酢酸緩衝

% の 3 糖類、4.8 ~ 5.2 % の 2 糖類および 2.1 ~ 2.6 % の単糖類 (いずれも全糖に対する重量%) が含まれていた。

## 実施例 8

サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラ (*Saccharopolyspora rectivirgula*) の  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を利用した、ガラクトオリゴ糖を含有する乳糖分解乳の製造:

牛乳 (乳糖濃度 4.8%、無脂乳固形分濃度 8.3%) を 60℃ に加温し、これにサッカロポリスボラ・レクチヴィルグラから得た  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を乳糖 1 g あたり 1.6 ~ 2.4 LU 添加し、4 ~ 7 時間反応させた。次いでショーデックス・イオンパック KS 801 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (移動相、水; カラム温度、70℃; 流速、1.0 ml/min; 検出、示差屈折計) により、上記処理後の牛乳中の

溶液 (pH 5.0) に溶解した溶液に、サーモノスポラ sp. SAM 1546、サーモノスポラ sp. SAM 1547、サーモアクチノマイセス sp. SAM 1544 およびサーモアクチノマイセス sp. SAM 1545 の各培養物より得た  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素、1 pNPGU を加えて最終容量 1.0 ml とし、65℃ で 8 時間反応させた。

反応液を 95℃ で 5 分間処理して反応を停止させ、1 部分を 10 倍に希釈してこれをショーデックス・イオンパック KS-801 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (移動相、水; カラム温度、70℃; 流速、1 ml/min; 検出、示差屈折計) で分析することにより反応液の糖組成を決定した。

この結果、いずれの起源の  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を用いた場合でも、反応液には 3 ~ 7 % の 4 糖以上のオリゴ糖、1.8 ~ 2.1

糖組成を分析した。その結果は第 5 表のとおりであった。なお、ガラクトシル基転移酵素のラクトース加水分解活性は、上記反応後もほぼ 100% 残存していた。

第 5 表

糖 類	糖 類 分 解 (酵素濃度、反応時間)		
	未 処 理	1 時間	4 時間
3 糖以上のオリゴ糖	0.000	10.700	11.400
乳糖	100.0	23.3	24.8
乳糖 (%)	0.0	88.0	83.9

## 実施例 9

ガラクトオリゴ糖を含有する乳糖分解乳の製造における、サッカロポリスボラ・レクチヴィルグラから得た  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素の牛乳中での安定性をさらに詳しく調べた。

第 6 表

反応温度 (°C)	反応時間 (時間)	酵素の残存活性 (%)	
		S. レクチフィングラ	B. サーキュランス
60	0	100	100
	1	100	77
	2	100	78
	4	100	78
	8	100	71
65	0	100	100
	1	100	38
	2	100	15
	4	100	0
	8	100	0
70	0	100	100
	1	80	3
	2	80	0
	4	80	0
	8	11	0

牛乳（乳糖濃度 4.8%、無脂乳固形分濃度 8.3%）を 60、65、70℃ の各温度に加熱し、これにサッカロポリスボラ・レクチフィングラの  $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素を牛乳 1 ml あたり 24 pNPGU 添加し、反応を開始した。反応中の酵素の残存活性を求めるため、反応開始後 1、2、4、8 時間後に、反応液の一部（0.02 ml）をサンプリングして 1.0 ml の牛乳に添加し、60℃ で 1 時間反応させ、その牛乳中の乳糖の減少速度を測定した。また、これと同様の実験を、バシルス・サーキュランス（*Bacillus circulans*）の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ビオラクタ、大和化成製）についても行ない、比較した。この結果を第 6 表に示す。

（以下余白）

以 上

出 願 人 サントリー株式会社

代 理 人 弁 理 士 小 野 信



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

 //(C 12 N 9/10  
 C 12 R 1:01)

②発 明 者	中 尾	正 宏	大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号	サントリー株式会社基礎研究所内
②発 明 者	柴 野	裕 次	大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号	サントリー株式会社基礎研究所内
②発 明 者	天 知	輝 夫	大阪府三島郡島本町若山台 1 丁目 1 番 1 号	サントリー株式会社基礎研究所内



## 手続補正書 (自発)

平成 2 年 11 月 8 日

特許庁長官 補 松 敏 隆

## 1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第 2 4 6 7 9 2 号

## 2. 発明の名称

新規耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素、その製造法  
及びその用途

## 3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 (190) サントリー株式会社

## 4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区神田佐久間町3丁目15番

番井ビル7階 (〒101)

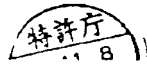
電話 03-5887-9870

氏 名 (8632) 弁 理 士 小 野 信



## 5. 補正命令の日付

自 発



## (7) 同 第15頁、第6行

「目的とする $\beta$ -ガラクトシル」とあるを「目的とする耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル」と訂正する。

## (8) 同 第30頁、第3行

「の $\beta$ -ガラクトシル」とあるを「の耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル」と訂正する。

## (9) 同 第32頁、第3行

「(5) 基質特異性ならびにミカエリス定数」とあるを

「(5) 基質特異性」と訂正する。

## (10) 同 第33頁、第2表中、第3段

「p-ニトロフェニル- $\beta$ - >1%」とあるを「p-ニトロフェニル- $\beta$ - <1%」と訂正する。

## (11) 同 第33頁、第2表中、第4段

「p-ニトロフェニル- $\beta$ - >1%」とあるを「p-ニトロフェニル- $\beta$ - <1%」と訂正する。

## (12) 同 第37頁、第3行

「0.01M」とあるを

「0.01M」と訂正する。

## 6. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 7. 補正の内容

## (1) 明細書中、第7頁、第15行

「等と同様」とあるを

「等と同様」と訂正する。

## (2) 同 第11頁、第12行

「成育しにくなり」とあるを

「成育しにくくなり」と訂正する。

## (3) 同 第13頁、第20行

「により $\beta$ -ガラクトシル」とあるを「により耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル」と訂正する。

## (4) 同 第14頁、第10行

「新規な $\beta$ -ガラクトシル」とあるを「新規な耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル」と訂正する。

## (5) 同 第14頁、第13行

「本発明の $\beta$ -ガラクトシル」とあるを「本発明の耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル」と訂正する。

## (6) 同 第15頁、第1行

「目的とする $\beta$ 」とあるを「目的とする耐熱性 $\beta$ 」と訂正する。

## 手続補正書 (自発)

平成 2 年 12 月 28 日

特許庁長官 補 松 敏 隆

## 1. 事件の表示

平成 2 年 特許願 第 2 4 6 7 9 2 号

## 2. 発明の名称

新規耐熱性 $\beta$ -ガラクトシル基転移酵素、その製造法  
及びその用途

## 3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 (190) サントリー株式会社

## 4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区神田佐久間町3丁目15番

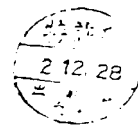
番井ビル7階 (〒101)

氏 名 (8632) 弁 理 士 小 野 信



## 5. 補正命令の日付

自 発



## 6. 修正の対象

「図面の簡単な説明」の欄および図面

## 7. 修正の内容

- (1) 明細書中、第50頁、第6表の次に行を挿えて次文を挿入する。

## 「実施例 10

耐熱性 $\beta$ -ガラクトシド基転移酵素を緩衝液A、Bに対して4℃で一晩透析した。また、耐熱性 $\beta$ -ガラクトシド基転移酵素をエチレンジアミン四酢酸(EDTA、終濃度、1mM)と4℃で1時間インキュベート後、緩衝液Cに対して4℃で一晩透析した。

各透析内液を、80℃で5、10、30、60、120、240分間加熱処理し、各時間ごとにその一定量をサンプリングした後、ただちに凍結し、p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを基質として「酵素化学的性質(9)」に記載した方法に基づき酵素の残存活性を測定した。

なお、緩衝液Cは0.01M リン酸緩衝液(pH 7.2)であり、緩衝液A、Bは20  $\mu$ M  $MnCl_2$ および20  $\mu$ M  $ZnCl_2$ をそれぞれ含む緩衝液Cである。

得られた結果を第1図に示す。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、マンガンおよび亜鉛イオンが熱安定性に及ぼす作用を示す図面である。

- (2) 第1図を別紙の通り追加する。

第 1 図

